

Interaksi Antagonistik antara *Lactobacillus* 5ns dan *Candida tropicalis*

Julistiono, H. ✉, R. Hardiningsih, T. Yulinery & R.N.R.Napitupulu.
Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI , Bogor

ABSTRACT

Antagonistic Interaction between *Lactobacillus* 5NS and *Candida tropicalis*. Centrifuged supernatant of medium where *Lactobacillus* 5NS grown inhibited growth of three strains of *Candida tropicalis*. The Inhibition activity was detected using paper disc method. When the supernatant was induced with living cells of *C. tropicalis* Y393 strain, it inhibited the tested yeast strains. Inhibition activities of this supernatant against *C. tropicalis* Y390, Y391 and Y393 were equivalent to that of phenol at the concentration of 20.56 , 25.02 and 25.04 mg/ml, respectively. However when the supernatant was induced with heated or living cells of *Candida tropicalis* Y390 and Y391, it did not show any inhibition activity on all yeast strain tested. Thus the data indicates that there may be a specific interaction between *Lactobacillus* 5NS and *C. tropicalis* Y393 in which under the induction of specific certain yeast such as *C. tropicalis* Y393, *Lactobacillus* 5NS produces a toxin-like that is not spesific for the yeast target. Such interaction between normal flora and pathogenic yeast may be happen in the digestive tractus.

Key words: *Lactobacillus*, yeast, *Candida tropicalis*, antagonist

PENDAHULUAN

Lactobacillus mempunyai potensi yang besar sebagai produk probiotik karena keunggulan-keunggulannya dibanding Bakteri Asam Laktat (B.A.L) lainnya (Davis & Gasson, 1981; Muriana & Klaenhemmer, 1987). Bakteri probiotik merupakan bakteri yang mempunyai efek menguntungkan bagi kesehatan inangnya jika dikonsumsi dengan jumlah yang cukup (Schaafsma, 1996). Efek menguntungkan ini bisa bersifat langsung atau tidak langsung. Secara langsung, *Lactobacillus* mensintesis senyawa anti-bakteri patogen (Tagg, 1976) seperti bakteriosin (Muriana & Klaenhemmer,

1987; Wagner *et al.*, 1997). Kajian secara *in vitro* menunjukkan bahwa bakteri probiotik *Bifidobacterium bifidum* yang beberapa galur dikomersialkan, dapat ditemukan di vagina dan dapat secara langsung menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* (Fujiwara *et al.*, 1997; Gibson & Wang, 1994). Kemudian Misra & Kuila (1995) menunjukkan kemampuan bakteri tersebut dalam menghambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae*. Ozbas & Aytac (1995) juga menunjukkan manfaat langsung bakteri probiotik ini dengan kemampuannya menghambat bakteri patogen *Yersinia enterocolitica*. Sedang secara tidak langsung, manfaat bakteri probiotik

✉ Jl. Ir. H. Juanda No. 18 Bogor 16002, Tel 0251-321038, Fax 325854

adalah dengan menaikkan respons humoral inang yang terserang patogen (Perdigon *et al.*, 1995).

Biak-biak yang diperoleh dari makanan fermentasi tradisional sekitar Jawa dan Sumatera menunjukkan keragaman genetik *Lactobacillus* yang tinggi, ditandai dengan keragaman profil plasmid (Napitupulu *et al.*, 1997) yang berhubungan dengan respons terhadap antibiotik (Hardiningsih *et al.*, 1999a). Dari penelitian sebelumnya, diketahui bahwa *Lactobacillus* 5NS dapat menghambat khamir *Candida tropicalis* dengan Diameter Daerah Hambat (DDH) tertinggi dari 11 galur yang diuji (Hardiningsih *et al.*, 1999b). Galur tertentu dari *Candida tropicalis* bersifat patogen khususnya pada vagina walau kemungkinan dapat ditemui pada saluran pencernaan, namun pada penelitian ini sifat patogenisitas khamir yang diuji belum diketahui.

Penelitian ini merupakan usaha untuk mendapatkan data tentang induksi sifat antagonistik *Lactobacillus* 5NS oleh khamir *Candida tropicalis*. Data ini diharapkan dapat dijadikan sebagai gambaran awal dari interaksi antara *Lactobacillus* asal makanan dan khamir yang diuji.

BAHAN DANCARA KERJA

Biak *Lactobaillus* dan *C. tropicalis*

Biak yang diuji adalah *Lactobacillus* 5NS yang merupakan hasil isolasi dari ikan selar dan sebagai koleksi Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang Biologi-LIPI, Bogor. Biak ini memiliki 3 plasmid berukuran 1,9 ; 2,5 ; dan >10 kb (Napitupulu *et al.*, 1997).

Biak *C. tropicalis* yang digunakan dalam penelitian ini adalah koleksi Balitbang Mikrobiologi, Puslitbang

Biologi-LIPI, Bogor. Masing-masing biak berkode Y 390, Y 391, dan Y 393. Ketiga khamir ini tidak mempunyai perbedaan morfologi atau fisiologi dalam kriteria jenis, namun mempunyai perbedaan dalam kemampuan metabolisme fenol (data tidak dipublikasi).

Pertumbuhan *Lactobacillus* dan khamir.

Untuk memperoleh biak *Lactobacillus*, biak diremajakan pada media GYP pada cawan petri dan diinkubasikan selama 48 jam. Koloni yang tumbuh diambil satu ose untuk diinokulasikan pada media 6 ml media MRS broth di tabung reaksi. Suspensi bakteri tersebut diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 30°C.

Biak-biak *C. tropicalis* disiapkan dengan meremajakannya dalam media cair ekstrak taoge 1%. Tiap liter media mengandung 150 g sukrosa, 1,3 g K₂HPO₄, 1,1 g (NH₄)₂SO₄, Mg SO₄. 7 H₂O 0,15 g. Biak diinkubasi dengan penggojokan (150 rpm) pada suhu ruang selama 48 jam.

Untuk mengetahui DDH *Lactobacillus* terhadap *C. tropicalis*, 0,1 ml suspensi khamir diinokulasikan pada media padat (20 g agar, 5 g pepton, 3 g “yeast extract”, 10 g glukosa, 0,5 g MgSO₄. 7 H₂O, 1 g K₂HPO₄, 0, 5 % larutan Rose Bengal 0, 5 ml, 1 l akuades) dan dioles secara merata dengan spatula. *Disc blank* berdiameter 6 mm direndam dalam suspensi *Lactobacillus*, kemudian diletakkan di atas media padat yang telah diinokulasi dengan khamir. Perlakuan dibuat dengan 3 ulangan. Pengukuran DDH dilakukan setiap 24 jam selama 3 hari. Untuk DDH pembanding, dibuat kurva standar DDH fenol terhadap khamir. Fenol digunakan sebagai pembanding karena selain harganya

murah, fenol juga salah satu senyawa pembanding yang digunakan dalam uji efektivitas antibiotik.

Induksi sifat antagonistik *Lactobacillus* terhadap khamir oleh khamir.

Induksi sifat antagonistik *Lactobacillus* terhadap *C. tropicalis* diteliti dengan mempelajari DDH dari berbagai filtrat terhadap pertumbuhan khamir. Filtrat tersebut adalah supernatan dari media tempat *Lactobacillus* tumbuh; supernatan *Lactobacillus* mengandung khamir setelah inkubasi selama 30 menit; supernatan *Lactobacillus* mengandung khamir yang sebelumnya diperlakukan dengan suhu 70°C selama 10 menit, kemudian diinkubasi selama 30 menit; dan filtrat media khamir.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seperti yang terlihat pada Tabel 1, sifat antagonisma *Lactobacillus* terhadap ketiga biak *C. tropicalis* muncul jika pada biakan *Lactobacillus* terdapat khamir Y393. Berdasarkan kurva standar DDH fenol terhadap khamir (Gambar 1, 2, dan 3), besar DDH supernatan terhadap Y390, Y391, dan Y393 masing-masing setara dengan 20, 56; 25,02; dan 25,04 mg/ml fenol. Sifat antagonisma tersebut tidak spesifik terhadap induktornya (Y393) saja tetapi juga terhadap khamir Y390 dan Y391. Dari Tabel 2, terlihat bahwa jika sel khamir Y393 dipanaskan (70°C 10 menit) terlebih dahulu, *Lactobacillus* tidak menunjukkan sifat antagonisma. Hal ini menunjukkan bahwa sifat induksi oleh khamir hanya terjadi jika khamir masih aktif, mengingat perlakuan 70°C 10 menit mengakibatkan kerusakan bermacam enzim. Juga, sifat antagonisma bukan berasal dari khamir yang diinduksi oleh *Lactobacillus* yang telah dilemahkan

(Tabel 2) atau berasal dari khamir tanpa induksi (Tabel 3).

Sudah lama dikenal bahwa sifat antagonisma BAL berasal dari senyawa yang diekskresikan oleh bakteri tersebut, yang disebut dengan bakteriosin. Beberapa bakteriosin telah diteliti oleh beberapa kelompok penelitian seperti Larsen *et al.*, 1993; Bhunia *et al.*, 1988; Ohmomo *et al.*, 1999; dan Ohmomo *et al.*, 2000. Pada umumnya, bakteriosin merupakan (gliko)protein. Aktivitas mirip bakteriosin pada *Lactobacillus* 5NS mungkin tergolong dalam kelompok bakteriosin. Kemungkinan, senyawa tersebut hanya diproduksi ketika BAL membutuhkannya, yakni ketika menerima signal dari mikroba targetnya. Dari segi pertukaran signal antara BAL dan khamir, masih banyak hal yang harus diungkap. Plasmid berperan dalam produksi bakteriosin seperti ditunjukkan oleh Ohmomo *et al.* (2000). Perlakuan *curing* dengan novobiocin pada BAL mengakibatkan hilangnya satu plasmid dengan ukuran terbesar sehingga kehilangan kemampuan produksi bakteriosin. Seperti diketahui bahwa *Lactobacillus* 5NS memiliki 3 plasmid, peran plasmid dalam produksi bakteriosin perlu diteliti. Karakterisasi senyawa bakteriosin dapat dilaksanakan dengan penggunaan enzim dengan aktivitas proteolitik dan amilolitik terhadap senyawa aktif BAL, serta karakterisasi senyawa yang terdapat pada supernatan dengan SDS-PAGE.

Dari segi interaksi BAL dengan mikroba yang terdapat pada tubuh inangnya, data ini menggambarkan ide bahwa BAL mungkin akan dapat efektif menghambat mikroba patogen tertentu jika terjadi interaksi antara keduanya, atau antara BAL dengan jenis sama tetapi beda galur.

Tabel 1. Induksi khamir terhadap kemampuan antagonisma *Lactobacillus* 5 NS yang diukur dari daerah hambat.

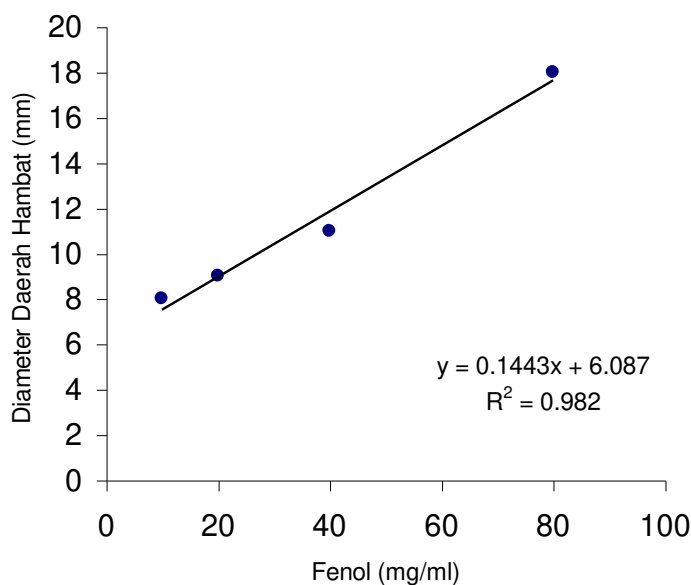
<i>C. tropicalis</i> strain	Hari pengamatan ke	Diameter Daerah Hambat, DDH (mm)				
		Media steril	Supernatan <i>Lactobacillus</i>	Supernatan <i>Lactobacillus</i> + Y390	Supernatan <i>Lactobacillus</i> + Y391	Supernatan <i>Lactobacillus</i> + Y393
Y390	1	-	-	-	-	11
	2	-	-	-	-	10
	3	-	-	-	-	9,7 *
Y391	1	-	-	-	-	11,7
	2	-	-	-	-	10
	3	-	-	-	-	9,7 **
Y393	1	-	-	-	-	12
	2	-	-	-	-	11
	3	-	-	-	-	9,7***

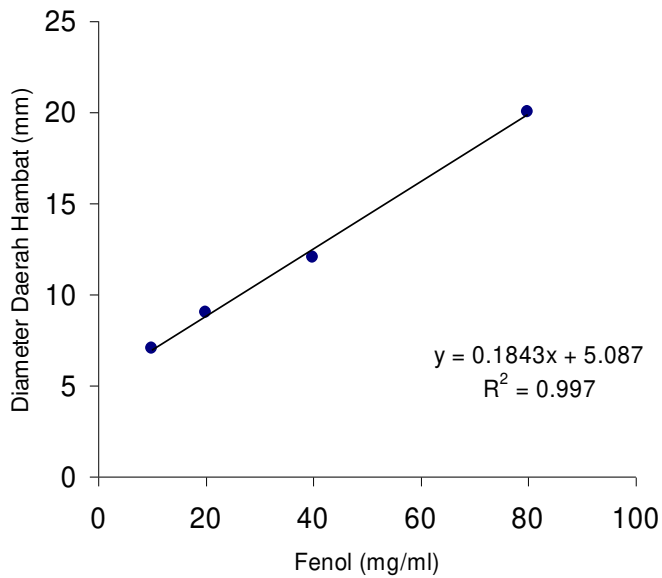
* dari gambar 1, DDH sebanding dengan 20,56 mg/ml fenol

** dari gambar 2, DDH sebanding dengan 25,02 mg/ml fenol

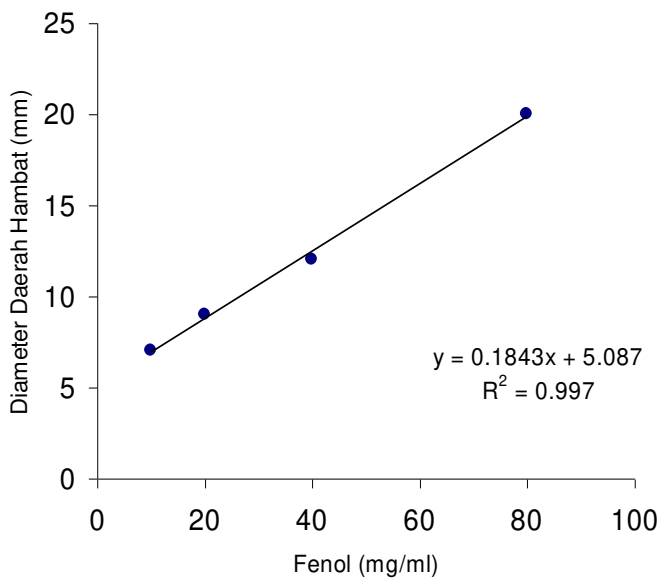
*** dari gambar 3, DDH sebanding dengan 25,04 mg/ml fenol

- penghambatan tidak ditemukan

**Gambar 1.** Kurva standar untuk membandingkan DDH supernatan dan fenol terhadap *C. tropicalis* Y 390. DDH diukur dengan metoda cakram uji antibiotik



Gambar 2. Kurva standar untuk membandingkan DDH supernatan dan fenol terhadap *C. tropicalis* Y 391. DDH diukur dengan metoda *Disc blank*



Gambar 3. Kurva standar untuk membandingkan DDH supernatan dan fenol terhadap *C. tropicalis* Y 393. DDH diukur dengan metoda *Disc blank*.

Tabel 2. Pengaruh pemanasan khamir dan/atau *Lactobacillus* 5 NS.terhadap kemampuan antagonisma *Lactobacillus* 5NS yang diukur dari daerah hambat.

<i>C. tropicalis</i> strain	Hari pengamatan ke	Diameter Daerah Hambat, DDH (mm)			
		Media steril	<i>Lactobacillus</i> (P) + Y393	<i>Lactobacillus</i> + Y393 (P)	<i>Lactobacillus</i> (P) + Y393(P)
Y390	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
Y391	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
Y393	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-

P (pemanasan) menunjukkan perlakuan dengan suhu 70 °C selama 10 menit.

- penghambatan tidak ditemukan

Tabel 3. Kemampuan antagonisma *C. tropicalis*.

<i>C. tropicalis</i> strain	Hari pengamatan ke	Diameter Daerah Hambat, DDH (mm)			
		Media khamir steril	Supernatan Y390	Supernatan Y391	Supernatan Y393
Y390	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
Y391	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
Y393	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-

- penghambatan tidak ditemukan

KESIMPULAN

Supernatan media *Lactobacillus* 5NS dapat menghambat pertumbuhan *C. tropicalis* Y390, Y391, dan Y393 jika pada biakan BAL tersebut terdapat juga khamir Y393 yang masih hidup. Hal ini mengindikasikan adanya interaksi spesifik antara BAL dan khamir Y393 sehingga akhirnya BAL memproduksi senyawa mirip bakteriosin dengan spektrum khamir target yang lebih luas dari induktornya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Proyek Litbang Pendayagunaan Biota Darat 1998/1999.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhunja, A.K., Johnson, M.C., & B. Ray. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 261-268.
- Davis, F.L. & Gasson. 1981. Reviews of the progress of dairy science: Genetics of Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Res.* 48:363-376.
- Gibson G.R & X. Wang. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77:412-420.
- Hardiningsih, R, T. Yulinery, E. Triana, R.N.R. Napitupulu, A. Kanti, & H. Julistiono. 1999a. Hubungan antara pola sensitivitas antibiotik dan profil plasmid *Lactobacillus* asal makanan fermentasi Indonesia. *J. Mikrob. Trop.* 2 : 45-50.
- Hardiningsih, R, T. Yulinery, E. Triana, R.N.R. Napitupulu, A. Kanti, & H. Julistiono. 1999b. Antagonisme beberapa biak *Lactobacillus* yang diisolasi dari makanan fermentasi terhadap khamir *Candida tropicalis*. *Laporan Teknik Proyek penelitian, Pengembangan dan Pendayagunaan Biota Darat 1998/1999*. Puslitbang Biologi - LIPI. h. 269-272.
- Fujiwara, S., H. Hahiba, T. Hirota, & J.F. Forstner. 1997.. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:506-512.
- Larsen, A.G., F.K. Vogensen, & J. Josephsen. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour dough: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M 1401. *J. Appl. Bacteriol.* 75:113-122.
- Misra, A.K & R.K. Kuila. 1995. Antimicrobial substances from *Bifidobacterium bifidum*. *Indian. J. dairy Sci.* 48:612-614.
- Muriana, P.M. & T.R. Klaenhemmer. 1987. Conjugal transfer of plasmid encoded determinant for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophyllus*. *Environ. Microbiol.* 88:1901-1906.
- Napitupulu, R.N.R., A. Kanti, T. Yulinery, R. Hardiningsih, & H. Julistiono. 1997. DNA Plasmid *Lactobacillus* asal makanan fermentasi tradisional yang berpotensi dalam pengembangan sistem Inang-Vektor untuk Biotek-

- nologi pangan. *J. Mikrob. Trop.* 1: 91-96.
- Ohmomo, S., M. Kobayashi, M. Yazima, P. Suyanandana, P. Budka, & P. Somchai. 1999. Screening of thermophilic lactic acid bacteria producing bacteriocin in the tropics. *JARQ*. 33:125-131.
- Ohmomo, S., S. Murata, N. Katayama, S. Nitisinprasat, M. Kobayashi, T. Nakajima, M. Yazima, & K. Nakanishi. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *J. Appl. Microbiol.* 88:81-89.
- Ozbas Z.Y & S.A. Aytac. 1995. Behavior of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in yogurt made with probiotic bacteria *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwiss.* 50: 626-629.
- Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero, & N. Gobbato. 1995. Immune system stimulation by probiotic. *J. Dairy. Sci.* 78:1597-1606.
- Schaafsma, G. 1996. State of art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr. Newsl.* 5:23-24.
- Tagg, J.R. 1976. Bacteriocin of Gram + bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:722-756.
- Wagner, R.D., C. Pierson, T. Warner, M. Dohnalek, J. Farmer, L. Robert, & E. Balish. . 1997. Biotherapeutic effect of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infection and Immunity.* 65: 4165-4172.